2B09-1 *Corynebacterium glutamicum* の *odhA* 発現調節株の代謝フラックス解析

佐藤 由康¹, ○金 鍾鈺², 白井 智量², 平沢 敬³,
 永久 圭介¹, 古澤 力¹, 清水 浩¹
 (1) 阪大院・情報・バイオ情報, (2) 阪大院・工・生命先端, (3) 慶
 応大・生命先端)

【背景及び目的】*C. glutamicum* のグルタミン酸生産においてはTCAサイクルの α -ketoglutarate (α -KG) 分岐の重要性が報告されている。本研究では2-oxoglutarate dehydrogenase complex (ODHC) 比活性に焦点を当て、ODHCのサブユニットの1つをコードする*odhA* 遺伝子の発現量を人為的に調節可能な菌株を構築して、グルタミン酸代謝フラックス解析することを目的とした。【方法及び結果】IPTG 添加により誘導可能な発現ベクターpECtを用いて、染色体上の*odhA* 遺伝子に加えてベクター上でも発現可能な*odhA* 発現過剰株、*odhA* 遺伝子から転写されたmRNAと相補するantisense RNAをベクター上で発現可能な*odhA* 発現抑制株を構築し、ODHC比活性とグルタミン酸生産の相関を観察した。*odhA* 発現過剰株はIPTG添加によって*odhA* タンパク質が過剰に発現し、Tween40添加条件下でグルタミン酸生産量が半減した。ODHC比活性が高く保たれ、 α -KGの分岐からグルタミン酸生産への代謝フラックスが抑制された。一方、*odhA* 発現抑制株ではODHC比活性を低下させることによって、グルタミン酸生産の誘導を試みた。IPTG添加によるantisense RNA発現のみではグルタミン酸生産は誘導されなかったが、Tween40添加条件下では親株に比べてグルタミン酸生産量が増加した。

Metabolic flux analysis of *Corynebacterium glutamicum* by control of *odhA* gene expression

Yoshiyasu SATO¹, ○Jongpill KIM², Tomokazu SHIRAI²,
 Takashi HIRASAWA³, Keisuke NAGAHISA¹, Chikara FURUSAWA¹,
 Hiroshi SHIMIZU¹
 (1) Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., (2) Dept. Biotech.,
 Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., (3) Inst. Adv. Biosci., Keio Univ.)

Key words *C. glutamicum*, glutamate, *odhA*, metabolic flux

2B09-3 Microbial production of xylitol from L-arabinose

○Yoshikiyo SAKAKIBARA¹, Badal SAHA²
 (1) Natl. Food Res. Inst., (2) Natl. Ctr. Agric. Util. Res.,
 USDA)

Xylitol is one of non-sugar sweeteners approved for use in foods and other items, in many countries. It has the same order of sweetness as sucrose with fewer calories and no unpleasant aftertaste. It is also well-known that xylitol is an anticariogenic sweetener. These properties make xylitol an extremely useful food ingredient, but xylitol is about six times the price of sucrose. Therefore, microbial production of xylitol using hemicellulosic biomass such as agricultural residues, is attractive for reducing the manufacturing cost. The hemicellulose hydrolyzates are generally rich in D-xylose and L-arabinose. Although a large number of microorganisms producing xylitol from D-xylose have been studied and evaluated their xylitol production, there are few studies on microbial production of xylitol from L-arabinose. We have developed a microorganism that can produce xylitol from L-arabinose at a high yield by transforming a new synthetic pathway into *E. coli*.

Microbial production of xylitol from L-arabinose

○Yoshikiyo SAKAKIBARA¹, Badal SAHA²
 (1) Natl. Food Res. Inst., (2) Natl. Ctr. Agric. Util. Res., USDA)

Key words xylitol, arabinose, *Escherichia coli*, fermentation

2B09-2 コリネ型細菌の持つ2つの補充経路のグルタミン酸生産における役割

○佐藤 裕紀¹, 折下 圭太¹, 白井 智量², 永久 圭介³, 平沢 敬⁴,
 清水 浩³, 和地 正明¹
 (1) 東工大院・生命理工・生物プロセス, (2) 阪大院・工・生命
 先端, (3) 阪大院・情報・バイオ情報, (4) 慶応大)

Corynebacterium glutamicum は、ピオチン制限や脂肪酸エステル界面活性剤の添加、ペニシリン処理などによってグルタミン酸を大量に菌体外に生産することが知られている。この菌はホスホエノールビルビン酸カルボキシラーゼ (PPC) とビルビン酸カルボキシラーゼ (PYC) の2つの補充経路を有しており、PYCはピオチンを補酵素としている。ピオチン制限下でのグルタミン酸生産におけるこの2つの補充経路の役割を調べるため、それぞれの遺伝子を欠損させた株を作成した。*ppc* 欠損株では全くグルタミン酸が生産されなかったことから、ピオチン制限下でのグルタミン酸生産は完全にPPC経路に依存していることが確認できた。一方、*pyc* 欠損株では野生株よりやや多いグルタミン酸の生産がみられたが、培地中に乳酸の蓄積が認められた。オキサロ酢酸の供給量を上げるためにPPC経路の増強を試みたところ、乳酸の蓄積が減少し、グルタミン酸取量の上昇が認められた。¹³C-グルコースを用いたフラックス解析から、PPC経路の増強による補充経路の強化がピオチン制限下でのグルタミン酸の生産効率の上昇に有効であることが示された。

Roles of two anaplerotic pathways in glutamic acid production by *Corynebacterium glutamicum*

○Hiroki SATO¹, Keita ORISHIMO¹, Tomokazu SHIRAI²,
 Keisuke NAGAHISA³, Takashi HIRASAWA⁴, Hiroshi SHIMIZU³,
 Masaaki WACHI¹
 (1) Dep. Bioen., Tokyo Inst. Technol., (2) Dept. Mat. Life Sci., Osaka Univ.,
 (3) Dept. Bioinfo. Eng., Grad. Sch. IST, Osaka Univ., (4) Keio Univ.)

Key words *Corynebacterium glutamicum*, L-glutamate, anaplerotic pathway

2B09-4 キャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) の麹菌 *Aspergillus oryzae* のメタボローム解析への応用

○寺林 靖宣¹, 山根 倫子¹, 佐野 元昭², 大箸 信一², 町田 雅之¹
 (1) 産総研・生物機能, (2) 金沢工大・ゲノム研)

<目的> 麹菌 *Aspergillus oryzae* は広く産業に用いられてきた重要な微生物であり、これまでに多くの知見が得られてきた。近年では、EST解析、ゲノム解読¹⁾が完了し、DNAマイクロアレイによる大規模な遺伝子発現情報も蓄積しつつある。これらの情報は、メタボロームの研究においても非常に有用であると期待される。今回はキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS) による主要代謝産物の一斉測定を行い、遺伝子発現分析の結果と併せたメタボローム解析を行った。

<方法および結果>

麹菌 *A. oryzae* RIB40株をYPD培地で30°C、22時間培養した。得られた菌体から代謝物質の抽出を行い、サンプルとした。CE-MSで測定した結果、アミノ酸を中心とした主要代謝物質が検出された。また、CD培地に植え替え、更に8時間培養したものについても同様の測定を行い、比較解析を行った。さらにDNAオリゴマイクロアレイによる遺伝子発現の結果²⁾と併せ、炭素飢餓の影響を代謝パスごとに解析した。

1) Machida *et al.* Nature, 438: 1157-61 (2005)

2) 佐野ら : 生物工学会大会要旨, p138 (2004)

An application of capillary electrophoresis mass spectrometry (CE-MS) for metabolome analysis of *Aspergillus oryzae*

○Yasunobu TERABAYASHI¹, Noriko YAMANE¹, Motoaki SANO²,
 Shimichi OOHASHI², Masayuki MACHIDA¹
 (1) AIST, (2) KIT)

Key words metabolomics, *Aspergillus oryzae*, CE-MS, DNA microarray